



НГУЕН ТХИ НЯТ ТХАНГ

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛКЕНИЛПРОИЗВОДНЫХ
ПИРИДОКСИНА**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» в Химическом институте им. А.М. Бутлерова и Научно-образовательном центре фармацевтики

Научный руководитель:

Штырлин Юрий Григорьевич

доктор химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Озеров Александр Александрович

доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой фармацевтической и
токсикологической химии ФГБОУ ВО
«Волгоградский государственный медицинский
университет» Министерства Здравоохранения
Российской Федерации, г. Волгоград

Газизов Альмир Сабирович

доктор химических наук, старший научный
сотрудник лаборатории элементоорганического
синтеза им. А.Н. Пудовика ФГБУН «Институт
органической и физической химии им. А.Е.
Арбузова» Казанского научного центра
Российской академии наук, г. Казань

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва

Защита диссертации состоится «14» сентября 2017 г. в 14 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.081.30 на базе ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова КФУ, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Электронные версии диссертации и автореферата размещены на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: <http://www.kpfu.ru>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.081.30,
кандидат химических наук



Якимова Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Направленный синтез и установление взаимосвязи структуры органических соединений с их биологическими свойствами являются одним из приоритетных направлений современной органической химии. В настоящее время наиболее актуальной является задача синтеза биологически активных соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью, поскольку смертность от рака в мире продолжает неуклонно возрастать и, по прогнозам Всемирной организации здравоохранения, через несколько лет выйдет на первое место, превысив смертность от сердечно-сосудистых заболеваний.

В течение последних двух десятилетий, сначала в отделе прикладной химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета, а позднее и в отделе медицинской химии Научно-образовательного центра фармацевтики КФУ, проводятся систематические исследования по синтезу и исследованию биологических свойств производных природного соединения пиридоксина, вовлеченного в метаболизм с более 100 ферментами. Несмотря на то, что многие физико-химические и биологические свойства производных пиридоксина уже изучены достаточно хорошо, синтетический потенциал этих соединений остается по-прежнему весьма обширным.

В настоящей работе сконцентрировано внимание на синтезе производных пиридоксина, содержащих алкенильный фрагмент в различных положениях пиридоксинового цикла. Целесообразность такой модификации была обусловлена тем, что, как известно из литературных данных, некоторые производные пиридоксина с алкенильными фрагментами обладают противоопухолевой активностью.

Степень разработанности темы исследования. Исследование биологической активности производных пиридоксина представляет значительный интерес для разработки новых высокоэффективных и безопасных лекарственных средств. В частности, синтез алкенилпроизводных пиридоксина и модификация образующейся двойной связи позволяет получить новый класс кандидатов в лекарственные средства, которые обладали бы высокой активностью и улучшенным профилем безопасности.

Цель и задачи исследования. Целью работы является синтез широкого ряда алкенилпроизводных пиридоксина и исследование их противоопухолевой активности.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

- разработка подходов к синтезу исходных фосфониевых солей и альдегидов на основе ацеталей пиридоксина;
- разработка и оптимизация подходов к синтезу широкого ряда алкенилпроизводных пиридоксина на основе реакции Виттига;
- исследование цитотоксичности *in vitro* полученных соединений на клетках рака молочной железы человека *MCF-7* и условно-нормальных эмбриональных клетках почки человека *HEK-293*, с последующим выявлением структуры соединений-лидеров;
- оптимизация химической структуры выявленных соединений-лидеров и исследование их противоопухолевой активности на широком ряде опухолевых клеток.

Научная новизна работы.

Впервые разработан синтетический протокол, позволяющий проводить реакцию Виттига четвертичных моно- и бисфосфониевых солей пиридоксина с рядом алифатических и ароматических альдегидов и оптимизированы методики выделения

целевых продуктов реакций. Реакцию проводили в закрытом сосуде под давлением при температуре (70-80) °С с использованием хлористого метилена в качестве растворителя. В ходе реакции образуются классические и неклассические продукты реакции Виттига.

Проведена реакция Виттига альдегидов пиридоксина с рядом ацилпроизводных фосфониевых солей и оптимизированы условия проведения данной реакции. Данным способом впервые были получены алкенилпроизводные, содержащие фрагмент природного соединения куркумина и халконовый фрагмент. Реакции протекают преимущественно с образованием *E*-алкенов с выходом более 70 %. Показано, что соединения, содержащие фрагмент куркумина, в растворе находятся в виде смеси двух таутомеров – дикетонной и кето-енольной формы – в близких соотношениях, однако кето-енольная форма несколько преобладает. Установлено, что положение таутомерного равновесия не зависит от природы растворителя.

Предложенный способ является удобным методом синтеза широкого ряда *E*- и *Z*-алкенилпроизводных пиридоксина по пятому и шестому положению пиридоксинового цикла.

Впервые реакцией альдольно-кетоновой конденсации 3,4-диметоксибензальдегида и 3-гидрокси-4-метоксибензальдегида (ванилина) с рядом алкенилпроизводных пиридоксина, содержащих халконовый фрагмент по пятому положению пиридоксинного цикла, получены соответствующие несимметричные аналоги C5-куркумина.

Впервые современными методами – МТТ-тестом и конфокальной микроскопией – изучены противоопухолевые свойства ряда синтезированных алкенилпроизводных пиридоксина. Выявлено, что наиболее активными и безопасными являются соединения, содержащие стильбеновый фрагмент в шестом положении или халконовый фрагмент в пятом положении пиридоксинового цикла.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны синтетические подходы, позволяющие получать ряд биологически активных алкенилпроизводных пиридоксина по пятому и шестому положению пиридоксинового цикла. Реакция Виттига с использованием фосфониевых солей пиридоксина или альдегидов пиридоксина в качестве исходных соединений эффективно протекает в хлористом метиле в присутствии избытка основания (триэтиламина или гидрида натрия) при (70-80) °С в закрытом сосуде под давлением. Реакция альдольно-кетоновой конденсации производных пиридоксина, содержащих халконовый фрагмент, с 3,4-диметоксибензальдегидом и ванилином протекает в хлористом метиле при 70 °С в течение 7 дней. Разработанные методы могут широко применяться в лабораторных синтезах.

Показано, что некоторые синтезированные алкенилпроизводные пиридоксина проявляют *in vitro* высокую противоопухолевую активность, сопоставимую или превосходящую таковую для препаратов сравнения – доксорубина и тамоксифена. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых высокоэффективных и безопасных противоопухолевых лекарственных средств.

Методология и методы исследования. Соединения получены с использованием различных методов классического органического синтеза. Состав и структура соединений доказаны с помощью методов масс-спектрометрии высокого разрешения в комплексе с ВЭЖХ, спектроскопии ЯМР (¹H, ¹³C, NOESY, COSY, HSQC), ИК-спектроскопии и PCA. Цитотоксичность исследуемых соединений определена с использованием пролиферативного МТТ-теста.

Положения, выносимые на защиту.

- Методики синтеза алкенилпроизводных пиридоксина по реакции Виттига;
- Данные по стереохимии и кето-енольному равновесию продуктов реакции Виттига - алкенилпроизводных пиридоксина;
- Результаты исследования противоопухолевой активности полученных алкенилпроизводных пиридоксина и структура соединений-лидеров;
- Результаты оптимизации химической структуры выявленных соединений-лидеров с целью увеличения их противоопухолевых свойств.

Личный вклад автора. Автор участвовал в постановке цели и задач исследования. Автором самостоятельно проведен анализ литературных данных, выполнена экспериментальная работа по синтезу и исследованию противоопухолевых свойств алкенилпроизводных пиридоксина. Автор принял участие в обсуждении результатов и формулировке выводов, подготовке статей и тезисов докладов. Все соединения, представленные в диссертационной работе, синтезированы соискателем лично.

Степень достоверности.

- Использование современных методов исследования структуры соединений обеспечивает достоверность полученных результатов.
- Цитотоксичность исследуемых соединений определена с использованием общепринятого пролиферативного МТТ-теста с использованием планшетного ридера TECAN (Швейцария).

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на IV и V Всероссийских конференциях "Современные проблемы химической науки и фармации" (Чебоксары, 2015, 2016), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2016), Кластере конференций по органической химии «ОргХим» (Санкт-Петербург, 2016), Международной конференции молодых учёных по химии «Менделеев-2017» (Москва, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы три статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и шесть тезисов докладов. Подано две заявки на патент РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 37 схем, 13 таблиц, 26 рисунков и состоит из введения, трех основных глав, выводов и списка цитируемой литературы, насчитывающего 192 источника.

В первой главе представлен обзор литературы, в котором рассматриваются синтез и свойства производных пиридоксина, реакция Виттига в синтезе функционализированных алкенов, а также биологические свойства этих алкенов. Во второй главе приведены результаты исследований по синтезу алкенилпроизводных пиридоксина и исследованию их противоопухолевой активности. В третьей главе представлена экспериментальная часть.

Работа выполнена в Научно-образовательном центре фармацевтики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и является частью исследований по основному научному направлению Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ «Синтез, строение, реакционная способность и практически

полезные свойства органических, элементоорганических и координационных соединений».

Диссертационная работа выполнялась в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности (по заданию № 12.67.2014/К) «Синтез и оптимизация структуры соединений-лидеров – кандидатов в противоопухолевые, ноотропные, антихолинэстеразные, противомикробные и сердечно-сосудистые лекарственные средства» (2014-2016 гг.).

Автор выражает благодарность и признательность научному руководителю д.х.н. Штырлину Ю.Г., к.х.н. Павельеву Р.С. и к.х.н. Пугачеву М.В. за постоянную всестороннюю поддержку и понимание, а также за ценные советы и активное участие при обсуждении работы, к.б.н. Иксановой А.Г. и к.б.н. Бондарь О.В за помощь в проведении биологических экспериментов, д.х.н. Балакину К.В. за помощь в анализе механизма противоопухолевого действия некоторых синтезированных соединений, д.х.н. Племенкову В.В. за помощь в анализе ИК-спектров, к.х.н. Кошкину С.А. и инженеру Гришаеву Д.Ю. за съемку масс-спектров, к.ф.-м.н. Гнездилову О.И. и инженеру Хаярову Х.Р. за съемку ЯМР-спектров, д.х.н. Катаевой О.Н. и к.х.н. Лодочниковой О.А. за проведение рентгеноструктурного анализа, к.х.н. Штырлину Н.В., к.х.н. Стрельнику А.Д., к.х.н. Гарипову М.Р., к.б.н. Казаковой Р.Р., студенту Булатову Т.М., студенту Зиганшиной А.А. и всем сотрудникам отдела медицинской химии Научно-образовательного центра фармации за помощь в проведении работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Реакция Виттига фосфониевых солей пиридоксина с карбонильными соединениями

1.1. Синтез моноалкенилпроизводных пиридоксина

Алкенилпроизводные пиридоксина получали реакцией Виттига монофосфониевой соли пиридоксина **2** с рядом ароматических и алифатических альдегидов.

Для синтеза алкенилпроизводных **4a-e** и **5a-e** использовали разнообразные ароматические и алифатические альдегиды. В качестве ароматических альдегидов были выбраны бензальдегид (**3a**) как простейший представитель данного класса и его нетоксичные производные - 3,4-диметоксибензальдегид (**3b**) и 4-гидрокси-3-метоксибензальдегид (**3c**) (ванилин). Алифатические альдегиды представлены пропиональдегидом (**3d**) и его более липофильным гомологом - ноноальдегидом (**3e**). Реакции проводили в хлористом метиле под давлением при 80 °С в течение 5-10 ч (схема 1). Для разделения полученной смеси *E*- и *Z*-изомеров была использована препаративная колоночная хроматография.

В кристалле вещество **4b** представлено двумя независимыми молекулами с практически одинаковой геометрией. Вдоль кратной связи наблюдается трансoidная конформация, шестичленный гетероцикл находится в конформации "твист" (рисунок 1).

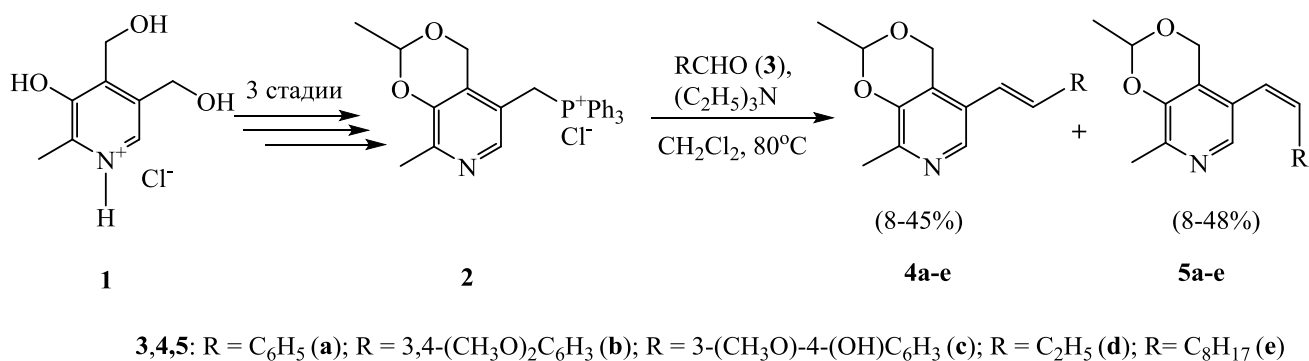
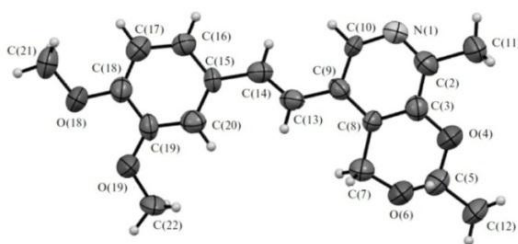


Схема 1

Рисунок 1 - Структура соединения **4b** по данным РСА (атомы пронумерованы в соответствии с экспериментом)

Установлено, что при воздействии ультрафиолетового излучения на растворы *E*-изомеров **4a-c** наблюдается процесс их изомеризации в **5a-c**. Обратный процесс перехода *Z*-изомеров в термодинамически более стабильные *E*-изомеры протекает в течение нескольких часов, а для соединения **5c** особенно быстро (схема 2). По этой причине охарактеризовать **5c** в индивидуальном виде не удалось.

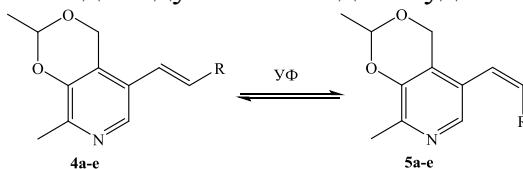
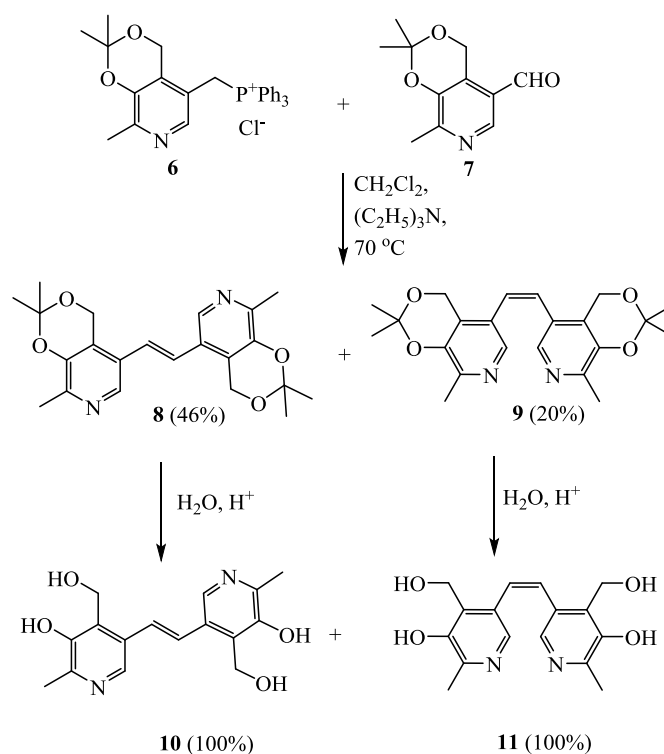


Схема 2

Симметричные моноалкенилпроизводные пиридоксина **8** и **9** были синтезированы в закрытом сосуде под давлением взаимодействием четвертичной фосфониевой соли **6** с альдегидом **7** в присутствии семикратного избытка триэтиламина. В ходе реакции образуется смесь *E*- и *Z*-изомеров в соотношении $\approx 2:1$ с преобладанием трансoidной структуры. Стереизомеры делили при помощи колоночной хроматографии на силикагеле. С целью получения тетролов **10** и **11** полученные соединения подвергали гидролизу в присутствии соляной кислоты. Реакция протекала с количественным выходом (схема 3).

В спектрах ЯМР ¹H сигнал ароматического протона *Z*-изомера **9** находится в более сильных полях по сравнению с аналогичным сигналом *E*-изомера **8**, что может быть связано с большим его экранированием в цисoidной форме молекулы. Дальнейшие исследования биологических свойств полученных соединений **8-11** оказались невозможными вследствие очень низкой растворимости этих веществ в культуральной среде.



1.2. Противоопухолевая активность соединений 4a-e

Для полученных соединений **4** была исследована цитотоксичность *in vitro* (таблица 1). Исследование провели на клетках аденокарциномы молочной железы *MCF-7*, глиобластомы *SNB-19* и колоректальной аденокарциномы *HCT-15*. В качестве условно-нормальных клеток использовали эмбриональные клетки почки *HEK-293*. Препаратом сравнения был выбран доксорубин - один из наиболее широко используемых цитостатиков. Согласно результатам проведенных исследований, все соединения по своей активности значительно уступают доксорубину. Отметим, что соединения **4a** и **4d** оказывают более значимый эффект в отношении условно-нормальных клеток по сравнению с опухолевыми, а соединение **4e** проявляет некоторую селективность в отношении опухолевых клеток *MCF-7*. Полученные результаты могут представлять интерес для фундаментальных исследований биохимии опухолевых клеток.

Таблица 1 - Цитотоксичность *in vitro* соединений 4a-e

	CC ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)		
		<i>MCF-7</i>	<i>SNB-19</i>	<i>HCT-15</i>
4a	36.1±0.1	67.8±1.0	112±3	100±21
4b	>306	>306	218±57	>306
4c	>320	>320	>320	>320
4d	35.9±4.7	218±14	163±18	281±4
4e	>165	29.8±0.1	97±4.1	157±11
Доксорубин	0.5±0.1	1.4±0.3	1.2±0.5	0.2±0.1

1.3. Синтез бис-алкенилпроизводных пиридоксина

Исходная фосфониевая соль **12** была получена из пиридоксина гидрохлорида **1** в четыре стадии по известной методике. Соединение **12** по данным РСА (рисунок 2) представляет из себя кристаллосольват, который состоит из фосфониевой соли и двух молекул растворителя – воды и ацетона. Стоит отметить, что хлорид-анионы образуют водородную связь с молекулой воды. При этом наличие молекулы воды является важной особенностью данного соединения и играет ключевую роль при получении целевых структур.

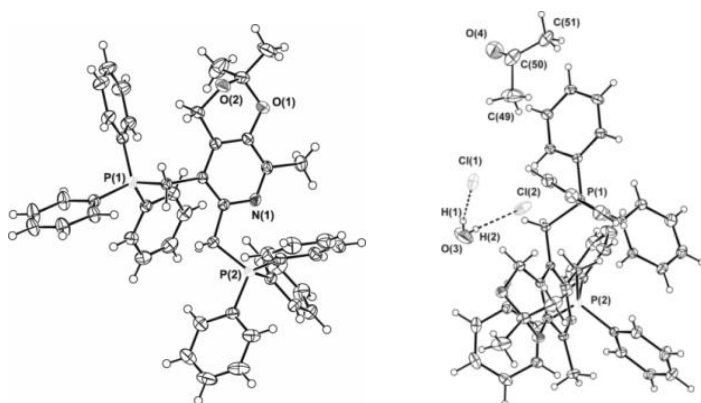


Рисунок 2 - Структура соединения **12** по данным РСА (вид с разных сторон, атомы пронумерованы в соответствии с экспериментом)

Реакция Виттига соли **12** с различными алифатическими и ароматическими альдегидами была проведена в закрытом сосуде под давлением (схема 4). Варьирование условий реакции (температуры, природы основания и растворителя) не привело к увеличению выхода целевых продуктов.

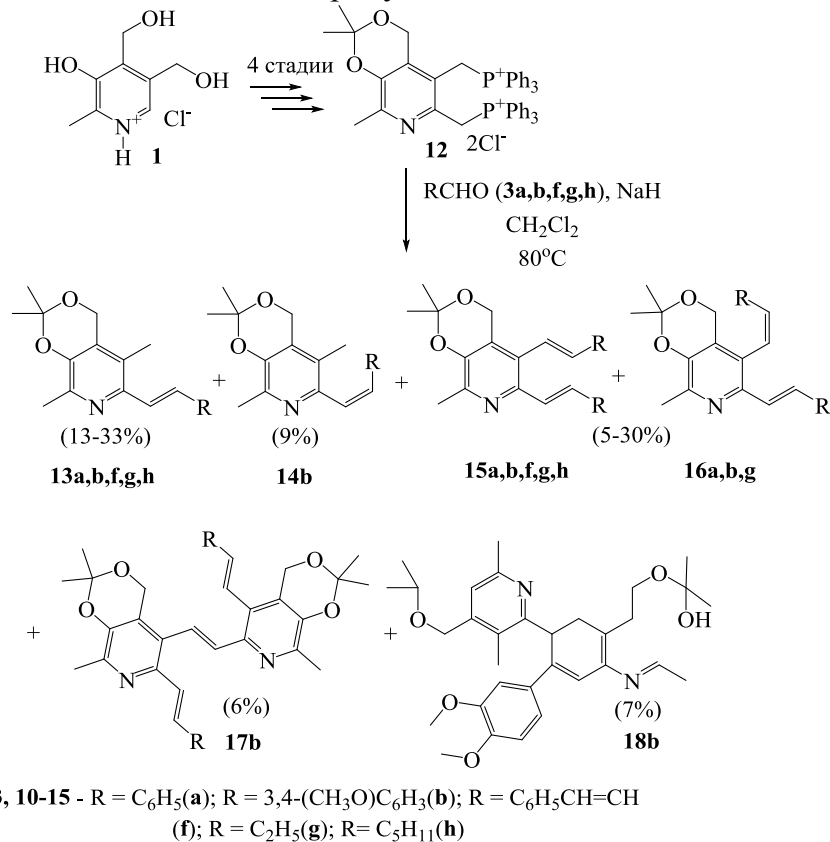


Схема 4

Методом колоночной хроматографии на силикагеле выделены соединения **13-18**. Выход продуктов представлен в таблице 2.

Основными продуктами синтеза, наблюдаемыми во всех исследованных реакциях, являются 5-метил-6-алкенилпроизводные **13** с *транс*-конфигурацией алкенильного фрагмента. Эти соединения были получены с выходом (13-33) %. Характерной их особенностью является наличие в спектре ЯМР ^1H сигналов протонов при двойной связи в области (6.5-7.7) м.д. (AB-квадруплет, $^3J_{\text{HH}} = 15.6$ Гц). В случае использования альдегида **3b** наблюдалось образование *цис*-алкена **14b** с выходом 9 % (AB-квадруплет, $^3J_{\text{HH}} = 12.2$ Гц).

В большинстве случаев исследуемые реакции приводят к очень сложной смеси продуктов, которые не могли быть разделены колоночной хроматографией и идентифицированы. Исключением стала реакция соли **12** с 3,4-диметоксibenзальдегидом **3b**, в которой образовавшиеся продукты удалось выделить.

Таблица 2 - Выход продуктов **13-18**

R	Выход продуктов 13-18, %					
	13	14	15	16	17	18
C_6H_5 (a)	30	-	14	19	-	-
3,4-(CH_3O) $_2\text{C}_6\text{H}_3$ (b)	21	9	9 (4:3)		6	7
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}$ (f)	13	-	9	-	-	-
C_2H_5 (g)	19	-	30 (5:1)		-	-
C_5H_{11} (h)	33	-	5	-	-	-

По аналогии с известным в литературе механизмом мы полагаем, что образование соединений **13** и **14** (схема 5) включает в себя реакцию исходной бисфосфониевой соли **12** с гидридом натрия с формированием бис-илида фосфора **12a**. На следующем этапе бис-илид **12a** гидролизуетсся с получением промежуточного моноилида **12b**. Последний реагирует с альдегидами **3** с образованием соответствующих олефинов **13** и **14**. Интересной особенностью описанного процесса является региоселективность реакции гидролиза илидных фрагментов. Согласно данным двумерного спектра ЯМР NOESY гидролиз протекает по пятому положению пиридоксина.

Согласно данным PCA молекула **13b** образует плоскую структуру с торсионными углами на этиленовом фрагменте, близкими к 180 градусам (рисунок 3).

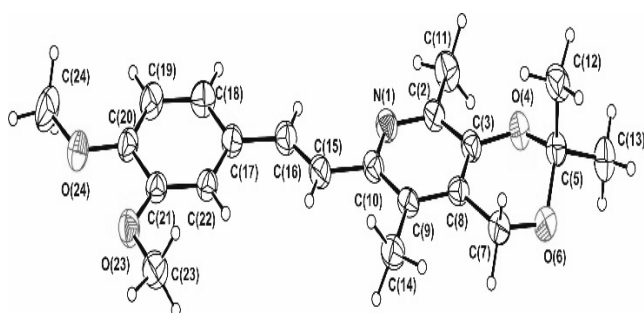


Рисунок 3 - Геометрия соединения **13b** по данным PCA (атомы пронумерованы в соответствии с экспериментом)

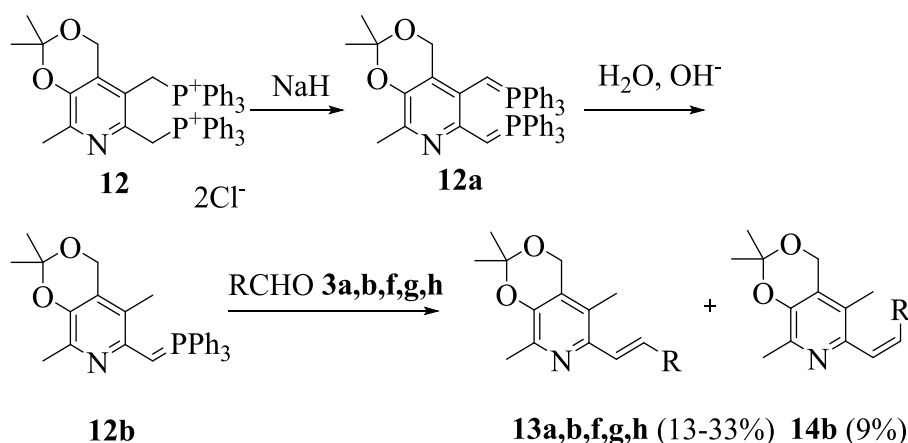


Схема 5

Целевые бис-алкенилпроизводные пиридоксина образуются с выходом (5-33) % в виде смеси *E,E*- и *E,Z*-изомеров или в индивидуальном виде (таблица 2). Спектр ЯМР ^1H смеси изомеров **15b** и **16b** характеризуется наличием четырёх АВ-квадруплетов в области (6.35-7.54) м.д. от восьми протонов четырех олефиновых фрагментов. Соотнесение сигналов было проведено с помощью двумерного спектра ЯМР COSY и спектроскопической корреляции с использованием спектров моноалкенилпроизводных.

При использовании 3,4-диметоксибензальдегида удалось выделить с низкими выходами неклассические продукты реакции Виттига **17b** и **18b**. Основываясь на известном в литературе механизме промышленного синтеза витамина А, мы предполагаем следующую последовательность реакций образования соединения **17b** (схема 6). Ключевой стадией реакции является окисление промежуточного бис-илида **12a** кислородом воздуха, которое приводит к формированию карбонилсодержащего илида **12c**. Затем проходит ряд согласованных межмолекулярных реакций Виттига с участием **12a**, **12c** и двух молекул **3b**. Данные реакции приводят к образованию соединения **17b** (выход 6 %), которое имеет редкую *Z*-образную конъюгированную структуру с *транс*-конфигурацией всех трех олефиновых фрагментов. Спектр ЯМР ^1H характеризуется наличием двух характерных АВХ-систем, соответствующих ароматическим протонам 3,4-диметоксифенильных фрагментов в области (6.70 – 7.09) м.д., а также наличием трех АВ-систем, соответствующих протонам алкенильных фрагментов в области (6.50 – 7.53) м.д.

Структура соединения **17b** также была доказана методом РСА (рисунок 4). Благодаря сопряженной системе, молекула **17b** имеет почти плоскую геометрию с некоторыми искажениями вокруг связи $\text{C}_{\text{ar}}-\text{C}_{\text{sp}^2}$. Такие геометрические особенности молекулы, по-видимому, связаны с ее высокой стерической загруженностью. Следует отметить, что структура **17b** обладает интенсивной зеленой флуоресценцией в видимой области спектра (максимум излучения при 550 нм).

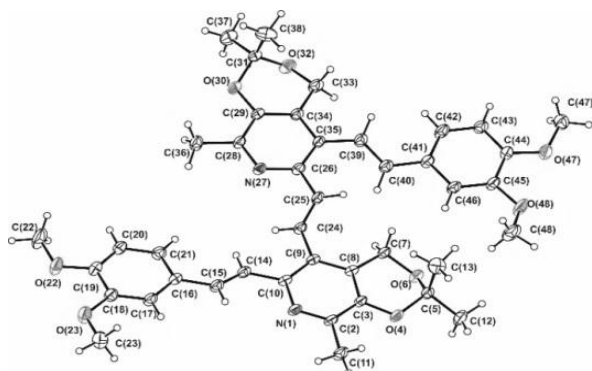


Рисунок 4 - Геометрия соединения **17b** по данным РСА (атомы пронумерованы в соответствии с экспериментом)

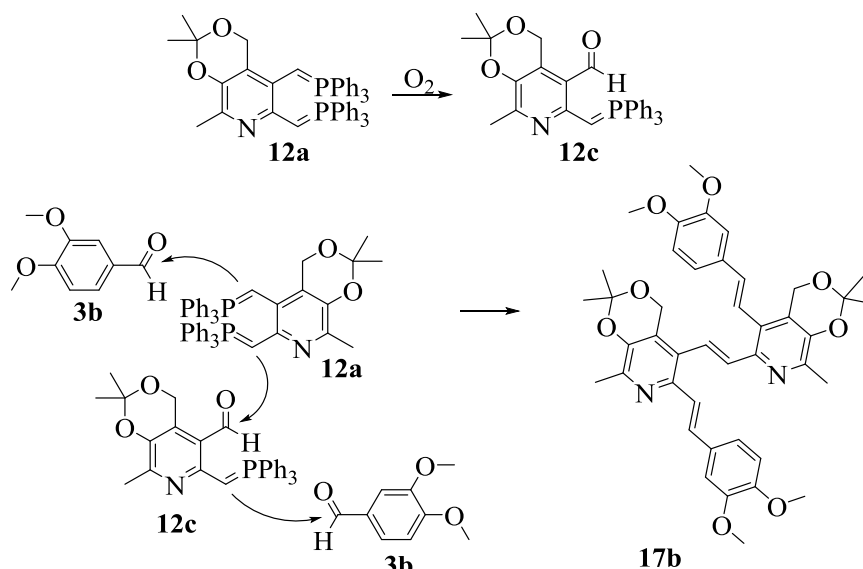


Схема 6

По аналогии с предложенным в литературе механизмом фотохимической реакции формирования 1,2-дигидронафталена мы полагаем, что промежуточный карбонилсодержащий илид **12c** вступает в реакцию с илидом **12b** и исходным альдегидом **3b**. Данные согласованные межмолекулярные реакции Виттига приводят к образованию бис-алкенильного производного **12d**. Далее структура **12d** претерпевает относительно редкий тип внутримолекулярной электроциклизации с образованием нестабильного промежуточного соединения **12e**, *1,5-H*-сдвиг которого приводит к формированию стабильного дигидрохинолинового производного **18b**. Спектр ЯМР 1H содержит характерную АВХУ-систему трех протонов в положениях 9 и 10 9,10-дигидро-1*H*-[1,3]диоксино[4,5-*c*]хинолинового фрагмента.

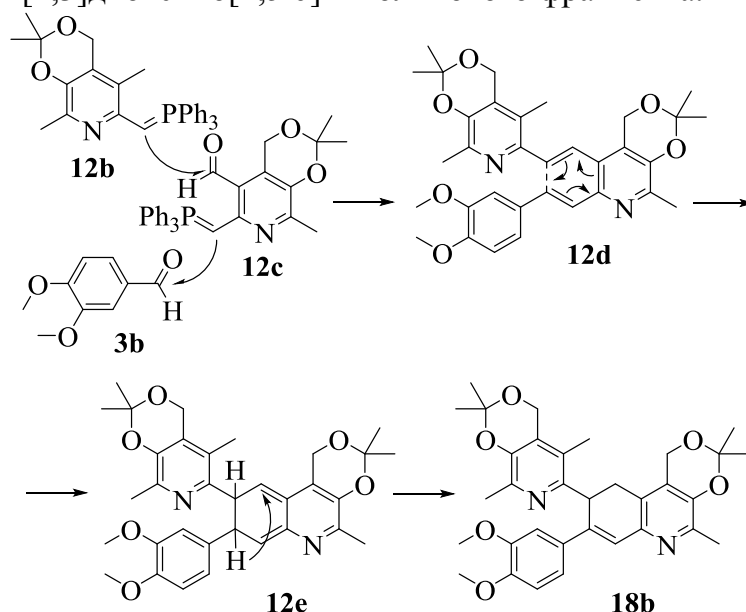


Схема 7

1.4. Противоопухолевая активность соединений 13-17

Для соединений **13-17** была исследована цитотоксичность *in vitro* на условно-нормальных эмбриональных клетках почки *HEK-293* и клетках аденокарциномы

молочной железы *MCF-7*. В качестве препарата сравнения был использован доксорубин (таблица 3). Согласно результатам эксперимента, соединения в большинстве своем оказались менее токсичны по отношению к линии условно-нормальных клеток. Выраженной селективностью к опухолевым клеткам обладает соединение **13b**, IC_{50} которого составляет 1.9 мкМ. Таким образом, синтезированные соединения представляют интерес для разработки новых высокоэффективных и нетоксичных цитостатиков.

Таблица 3 – Цитотоксичность *in vitro* соединений **13-17**

Соединение	IC_{50} (мкМ)	CC_{50} (мкМ)
	<i>MCF-7</i>	<i>HEK-293</i>
13a	81	2.7
13b	1.9	3.0
13f	182	96
13g	20.4	20.2
14b	32.4	23.1
15a	> 240	44.2
16a	169	14.9
15b+16b	2.9	0.5
17b	15.3	19.6
Доксорубин	1.4	1.2

2. Реакция Виттига альдегидов пиридоксина с фосфониевыми солями

2.1. Синтез альдегидов на основе пиридоксина

Шестичленные и семичленные ацетали (кетали) пиридоксина **19** и **20** были синтезированы по известным методикам. Окисление первичной гидроксильной группы полученных ацеталей проводили в ацетонитриле с использованием активированного MnO_2 . Выход карбонилсодержащих соединений **21** и **22** составляет (70-88) % (схема 8).

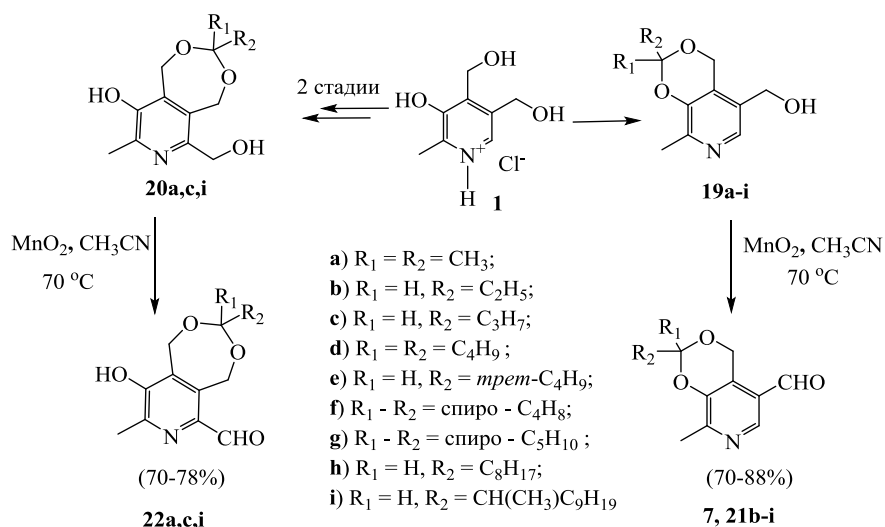


Схема 8

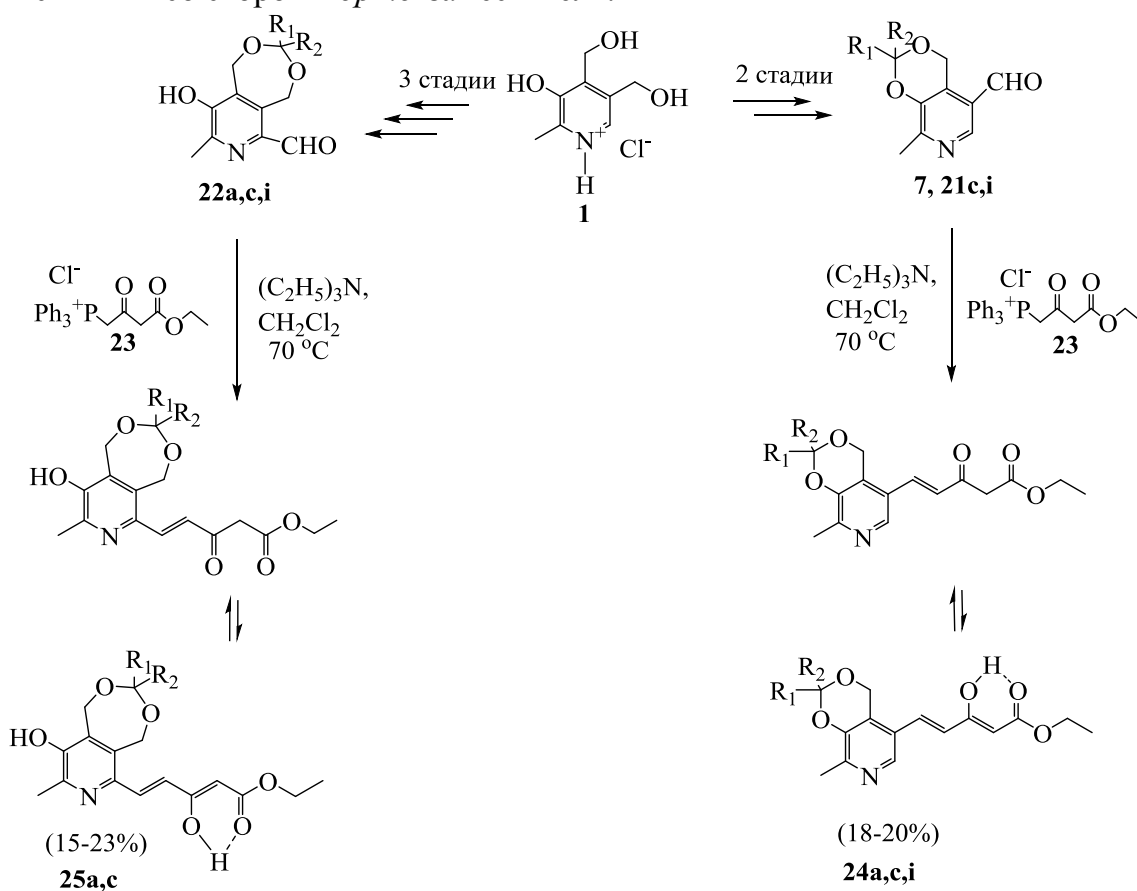
2.2. Синтез алкенилпроизводных по реакции Виттига альдегидов пиридоксина с фосфониевыми солями

С целью получения широкого ряда новых алкенилпроизводных пиридоксина полученные альдегиды были вовлечены в реакцию Виттига.

Алкенилпроизводные пиридоксина **27** и **28** получали по известной в литературе методике, последовательно прибавляя триэтиламин и соответствующий альдегид к раствору фосфониевой соли **26** в хлористом метиле. Реакцию проводили в течение трех дней при постоянном перемешивании в закрытом сосуде под давлением (схема 9).

Продукты были выделены с помощью колоночной хроматографии. Выход соединений **24** и **25** составил (15-23) % (таблица 4). Варьирование условий реакции (температуры, природы основания и растворителя) не привело к увеличению выхода целевых продуктов.

По данным ЯМР-спектроскопии, продукты **24** и **25** в растворах существуют в виде смеси двух таутомеров – дикетонной и кето-енольной формы в близких соотношениях (таблица 4). Следует отметить, что в продуктах реакции Виттига по шестому положению пиридоксинового цикла **25** дикетонной формы становится несколько больше, чем у соответствующих продуктов по пятому положению **24**. Получить соединение **25i** не удалось, что, по-видимому, связано со стерическими препятствиями со стороны *орто*-заместителя.



a) $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_3$; c) $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{C}_3\text{H}_7$; i) $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_9\text{H}_{19}$

Схема 9

Таблица 4 – Соотношение дикетонной/кето-енольной формы и выход продуктов **24,25**

Соединение	Соотношение дикетонная / кето-енольная форма	Выход %
24a	4:6	20
24c	4:6	18
24i	4:6	18
25a	5:6	15
25c	5:6	23

В спектре ЯМР ^1H смеси двух таутомеров характерными сигналами являются синглет от протонов дикетонной формы $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ в области 3.65 м.д. и синглет от протона кето-енольной формы $\text{C}(\text{OH})=\text{CHC}(\text{O})\text{O}$ в области 5.17 м.д.

С целью изучения влияния растворителей на кето-енольное равновесие соединения **24c** были изучены спектры ЯМР ^1H в различных неполярных и полярных апротонных и протонодонорных растворителях: хлористом метиле, ацетоне, диметилсульфоксиде, хлороформе и метаноле. Оказалось, что положение кето-енольного равновесия практически не зависит от природы растворителя.

Структура соединения **24a** была доказана методом РСА (рисунок 5). В кристалле соединения **24a** имеется внутримолекулярная водородная связь между атомом кислорода O(4B) и протоном H(3B), принадлежащим O(3B).

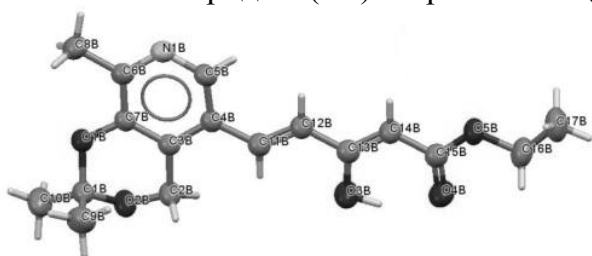


Рисунок 5 - Геометрия соединения **24a** по данным РСА (атомы пронумерованы в соответствии с экспериментом)

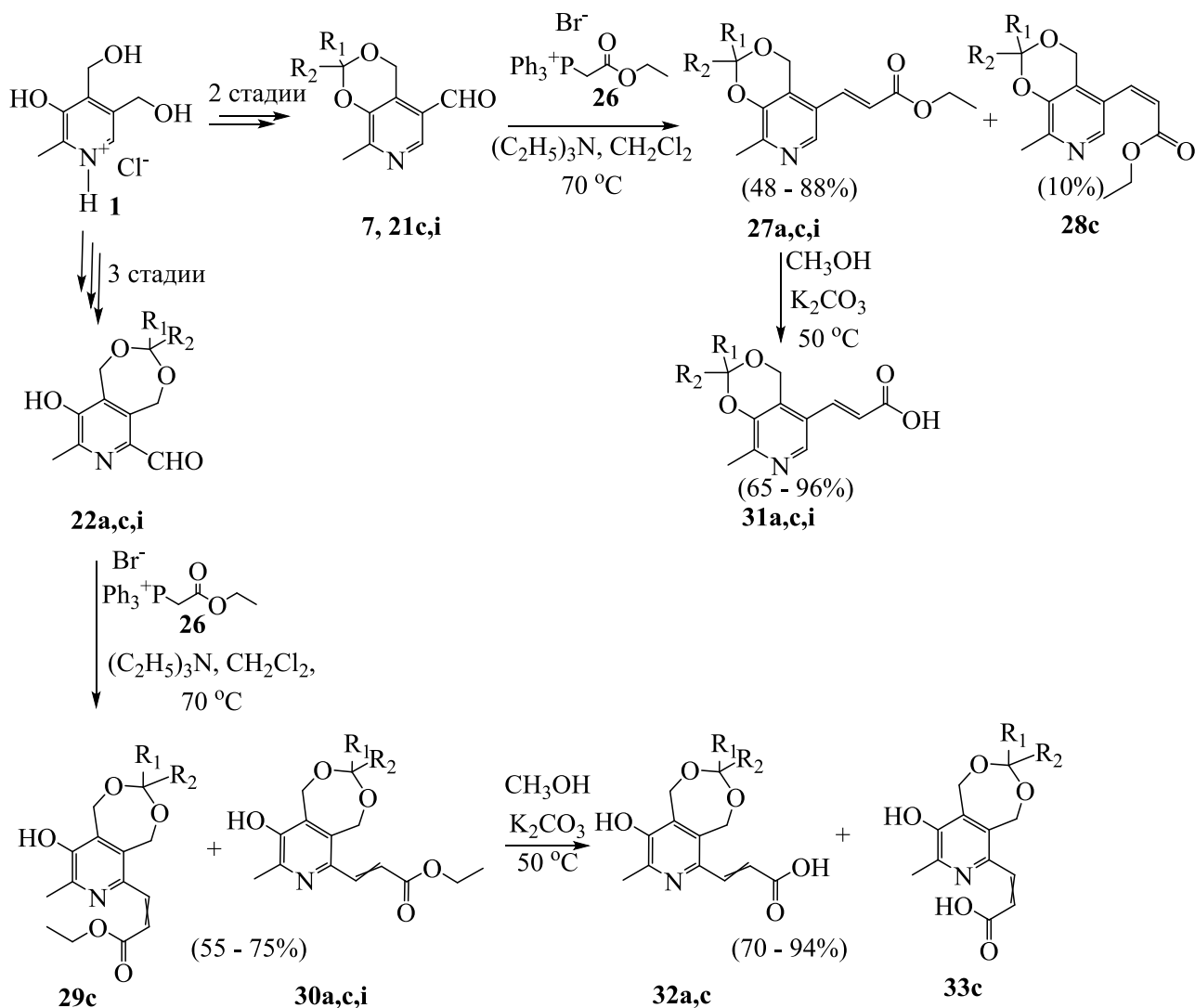
Алкенилпроизводные пиридоксина **27-33** были синтезированы из соответствующих альдегидов **21** и **22** с использованием фосфониевой соли **26** в одну-две стадии (схема 10). На первой стадии в ходе реакции Виттига образуются соответствующие алкенилпроизводные пиридоксина **27-30** в виде сложных эфиров. Реакцию проводили в закрытом сосуде в течение 24 часов. На следующем этапе соединения были подвергнуты гидролизу сложноэфирной группы с образованием соответствующих кислот **31-33**.

Таблица 5 – Соотношение *E/Z*-изомеров и выход продуктов **30-36**

Соединение	Отношение <i>E/Z</i>	Выход %	Соединение	Отношение <i>E/Z</i>	Выход %
27a	<i>E</i>	48	30i	<i>н.и.*</i>	75
27c	<i>E</i>	72	31a	<i>E</i>	96
27i	<i>E</i>	88	31c	<i>E</i>	65
28c	<i>Z</i>	10	31i	<i>E</i>	88
29c, 30c	<i>н.и.</i> ~4:1	55	32a	<i>н.и.</i>	94
30a	<i>н.и.</i>	76	32c, 33c	<i>н.и.</i> ~4:1	70

*не идентифицированы

Выделить продукт гидролиза липофильного соединения **32i** не удалось. В случае соединений **29**, **30**, **32**, **33** определить соотношение *E*- и *Z*-изомеров не представляется возможным из-за близости значений КССВ (таблица 5).



a) R₁ = R₂ = CH₃; c) R₁ = H, R₂ = C₃H₇; i) R₁ = H, R₂ = CH(CH₃)C₉H₁₉

Схема 10

Синтез алкенилпроизводных пиридоксина **35** и **36** проводили по реакции Виттига с использованием соответствующих альдегидов и фосфониевой соли **34** в закрытом сосуде под давлением в течение 24 часов (схема 11). Исходная фосфониевая соль была получена кипячением полуторакратного избытка трифенилфосфина с монохлорацетоном в хлороформе в течение суток. Продукты реакции Виттига с хорошими выходами были выделены с помощью колоночной хроматографии (таблица 6). Следует отметить, что данная реакция протекает стереоспецифично с образованием исключительно *E*-алкенов (данные ЯМР). Структура соединения **35g** доказана методом РСА (рисунок 6).

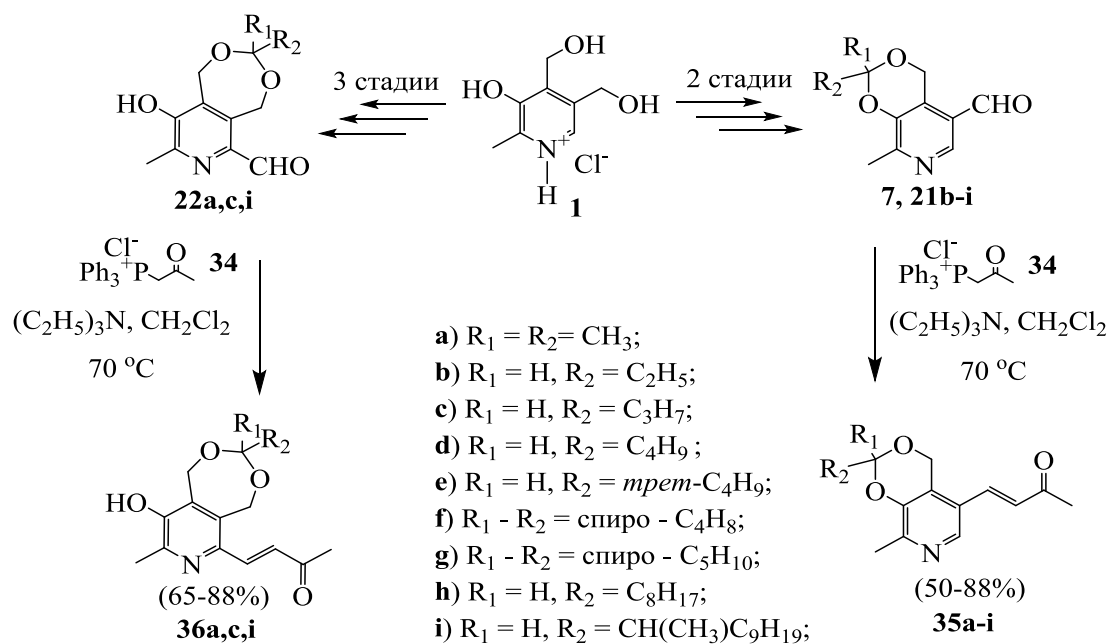


Схема 11

Алкенилпроизводное **37** получено снятием кетальной защиты с соединения **35a** (схема 12).

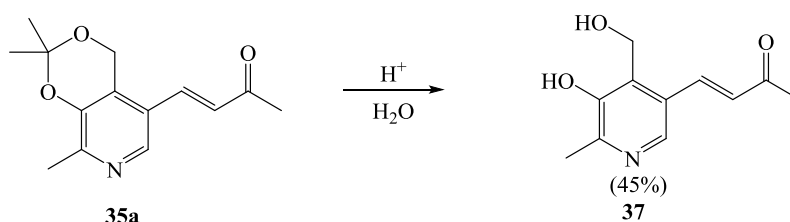


Схема 12

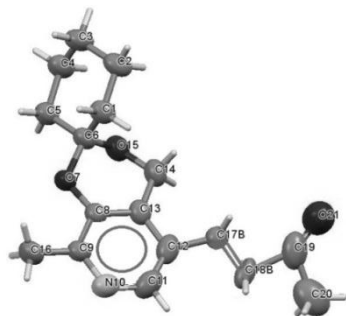


Рисунок 6 - Структура соединения **35g** по данным РСА (атомы пронумерованы в соответствии с экспериментом)

Таблица 6 – Соотношение *E/Z*- изомеров и выход продуктов **35-37**

Соединение	Соотношение <i>E/Z</i>	Выход, %	Соединение	Соотношение <i>E/Z</i>	Выход, %
35a	<i>E</i>	60	35h	<i>E</i>	80
35b	<i>E</i>	70	35i	<i>E</i>	80
35c	<i>E</i>	76	36a	<i>E</i>	60
35d	<i>E</i>	60	36c	<i>E</i>	88
35e	<i>E</i>	50	36i	<i>E</i>	65
35f	<i>E</i>	80	37	<i>E</i>	45
35g	<i>E</i>	88			

2.3. Противоопухолевая активность соединений 25-37

Изучение цитотоксичности полученных соединений **25-37** проводили *in vitro* на культуре условно-нормальных эмбриональных клеток почки *HEK-293* и на клетках аденокарциномы молочной железы *MCF-7*. В качестве препарата сравнения был использован доксорубин (таблица 7). Исследуемые вещества для улучшения растворимости в воде переводили в гидрохлориды. По причине низкой растворимости соединения **24** исследовать его специфическую активность не представилось возможным.

Таблица 7. Цитотоксичность *in vitro* соединений 25-37

Соединение	IC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	Соединение	IC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ
	<i>MCF-7</i>	<i>HEK-293</i>		<i>MCF-7</i>	<i>HEK-293</i>
25a	30.4	58.2	35d	1.3	12.8
25c	25.5	33.5	35e	4.1	1.2
31a	1120	763	35f	7.2	17.3
31i	14.1	9.2	35g	0.5	28.7
32a	993	170	35i	0.4	7.0
32c+33c	>3000	1339	36a	27.2	38.5
35a	6.6	17.3	36c	4.6	12.7
35b	5.7	35.6	36i	2.9	1.4
35c	2.2	2.9	37	398	122
Доксорубин	1.4	1.2	Доксорубин	1.4	1.2

Согласно результатам эксперимента, соединения **25a** и **25c** обладают цитотоксичностью по отношению к клеткам *HEK-293* в интервале концентраций (30-60) мкМ, а в интервале концентраций (25-30) мкМ – по отношению к клеткам *MCF-7*.

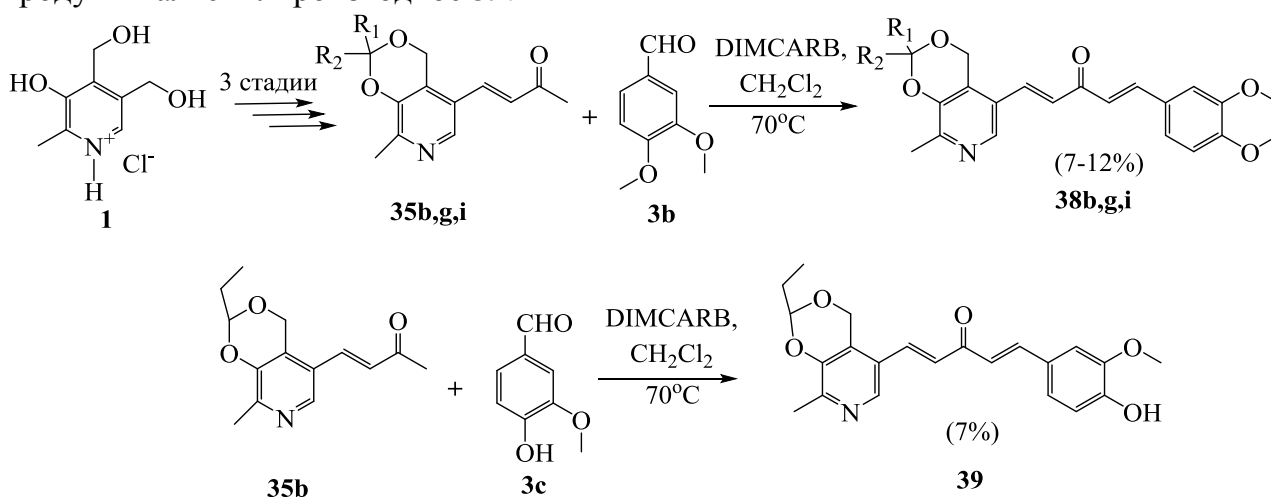
Результаты исследования иллюстрируют, что среди алкенилпроизводных **31-33** соединение **31i** обладает наибольшей активностью. Цитотоксичная концентрация соединения **31i** по отношению к опухолевым клеткам *MCF-7* составляет 14 мкМ, что, однако, в 10 раз больше цитотоксичной концентрации доксорубина. Помимо этого, данное соединение является очень токсичным по отношению к условно-нормальным клеткам *HEK-293*, что также делает данный класс соединений малоперспективным.

Оказалось, что алкенилпроизводные пиридоксина **35** и **36** обладают достаточно высокой противоопухолевой активностью. Их цитотоксичная концентрация по отношению к клеткам *HEK-293* лежит в интервале (1.2-38.5) мкМ, а по отношению к клеткам *MCF-7* – в интервале (0.4-27.2) мкМ. Так, соединение **35g** по сравнению с доксорубином в отношении опухолевой линии клеток *MCF-7* оказалось в 3 раза более активно, но при этом значительно менее токсично (почти в 60 раз). Алкенилпроизводное пиридоксина **37** без кетальной защиты оказалось бесперспективным. Следует отметить, что алкенилпроизводные по пятому положению пиридоксинового цикла оказались более активны, чем соответствующие производные по шестому положению.

Таким образом, синтезированные соединения, содержащие шестичленный ацетальный фрагмент с липофильными заместителями у ацетального атома углерода и алкенильный фрагмент в пятом положении пиридоксина цикла, представляют интерес для разработки противоопухолевых лекарственных средств.

3. Оптимизация химической структуры соединений-лидеров

В этой части работы была проведена оптимизация структур трех наиболее активных алкенилпроизводных пиридоксина **35b,g,i**. Для увеличения их противоопухолевой активности была проведена модификация пятого положения пиридоксина реакцией альдольно-кетоновой конденсации с 3,4-диметоксибензальдегидом и 3-гидрокси-4-метоксибензальдегидом (ванилином) до соответствующих аналогов С5-куркумина **38b,g,i** и **39** (схема 13). Реакцию проводили в хлористом метиле в присутствии избытка DIMCARB (диметилкарбамат диметиламмония, CAS 4137-10-4, 5 мол. экв.), поскольку классический синтез в водном этаноле в основной среде и в растворе соляной кислоты в ДМСО не приводит к целевым соединениям. Продукты реакции очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, выход реакций составляет от 7 % до 12 % (таблица 7). Следует отметить, что в случае реакции с ванилином удалось выделить лишь один продукт – алкенилпроизводное **39**.



b) $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{C}_2\text{H}_5$; g) $R^1 - R^2 = \text{спиро} - \text{C}_6\text{H}_5$; i) $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_9\text{H}_{19}$

Схема 13

Спектр ЯМР ^1H соединений характеризуется наличием одной АВХ-системы, соответствующей ароматическим протонам 3,4-диметоксифенильного фрагмента в области (6.90-7.20) м.д., а также наличием двух АВ-систем, соответствующих протонам алкенильных фрагментов в области (6.87-7.54) м.д.

Структура соединения **38b** подтверждена методом РСА (рисунок 7).

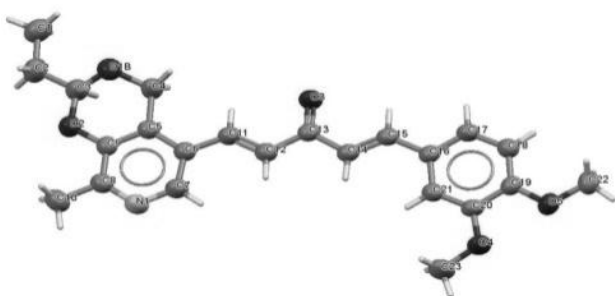


Рисунок 7 - Геометрия соединения **38b** по данным РСА (атомы пронумерованы в соответствии с экспериментом)

Цитотоксичные концентрации полученных алкенилпроизводных пиридоксина находятся в интервале (0.12-5.83) мкМ по отношению к клеткам *HEK-293*, а по отношению к клеткам аденокарциномы молочной железы *MCF-7* – в интервале (0.18-9.39) мкМ. Среди синтезированных аналогов С5-куркумина соединение **38b** обладает наиболее высокой противоопухолевой активностью (таблица 8). Однако, ввиду того, что оно обладает также и очень высокой токсичностью по отношению к условно-нормальным клеткам *HEK-293*, его нельзя отнести к оптимизированному соединению-лидеру. С этих позиций несколько более привлекательным выглядит соединение **39**, которое немного превосходит доксорубин по соотношению активность/безопасность.

Таблица 8 – Выход и цитотоксичность *in vitro* соединений **38** и **39**

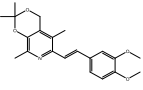
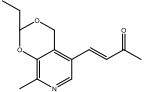
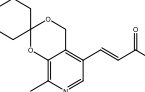
Соединение	Выход, %	Цитотоксичность полученных соединений <i>in vitro</i>	
		IC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ
		<i>MCF-7</i>	<i>HEK-293</i>
38b	12	0.2	0.1
38g	10	1.8	0.9
38i	7	9.4	5.8
39	7	1.2	1.8
Доксорубин		1.4	1.2

4. Противоопухолевая активность алкенилпроизводных пиридоксина – соединений-лидеров

Противоопухолевая активность соединений-лидеров была исследована на 12 линиях клеток (10 линий опухолевых клеток человека и 2 линии условно-нормальных клеток, таблица 9). В качестве препаратов сравнения были использованы доксорубин – противоопухолевый препарат первой линии химиотерапии рака молочной железы и тамоксифен – препарат для адъювантной химиотерапии. Согласно результатам экспериментов, соединение **13b** является нетоксичным и селективно воздействует только на клетки аденокарциномы молочной железы *MCF-7*, которые содержат эстрогеновые рецепторы. Следует отметить селективность в отношении именно эстроген-экспрессирующих клеток аденокарциномы молочной железы *MCF-7* на фоне клеток аденокарциномы молочной железы *MDA-MB-231* с пониженной экспрессией эстрогеновых рецепторов. В последнем случае противоопухолевая активность на порядок ниже.

Таким образом, синтезированные соединения могут представлять интерес при разработке противоопухолевых препаратов нового поколения, обладающих высокой специфической активностью и низкой токсичностью.

Таблица 9 - Цитотоксичность *in vitro* соединений **13b**, **35b** и **35g** (мкМ)

		13b	35b	35g	Доксору- бицин	Тамокси- фен
						
<i>HSF</i>	фибробласты кожи	291±23	18.9±0.1	15.6±3.3	2.2±0.2	
<i>HEK-293</i>	эмбриональные клетки почки	22.8±2.4	35.2±0.6	15.9±4.0	1.0±0.7	3.3±1.2
<i>MCF-7</i>	аденокарцинома молочной железы	1.9±0.9	3.9±2.7	1.1±0.7	1.2±0.1	20.5±6.9
<i>PC-3</i>	аденокарцинома простаты человека	308±6	9.5±1.6	10.2±1.0	14.1±0.9	
<i>A-498</i>	клетки почечной карциномы	291±13	17.0±0.6	6.5±0.4	12.2±0.9	
<i>SNB-19</i>	глиобластома	746±26	6.7±0.6	4.7±0.8	6.1±0.5	
<i>M-14</i>	меланома кожи	341±32	9.7±0.7	2.6±0.2	3.4±0.2	
<i>OVCAR-4</i>	аденокарцинома яичников	441.0±0.1	23.6±1.5	19.0±1.5	67±3	
<i>NCI-H322-M</i>	немелкоклеточна я карцинома легкого	368±11	10.6±0.5	4.6±0.5	124±14	
<i>HCT-15</i>	колоректальная аденокарцинома	235±54	2.1±0.1	1.5±0.1	2.2±0.3	
<i>HCT-116</i>	колоректальная карцинома	79±1	4.1±0.7	2.8±0.2	0.4±0.1	
<i>MDA-MB-231</i>	аденокарцинома молочной железы, эстроген негативная	18.7±2.3	3.1±1.5	1.8±0.6	0.3±0.1	10.4±5

На основании вышесказанного можно предположить, что биомишенью соединения **13b** являются эстрогеновые рецепторы. На рисунке 9 приведены известные структуры природного агониста эстрогеновых рецепторов **40** и селективных гормональных противоопухолевых лекарственных препаратов **41-43**, которые, как можно видеть, являются близкими структурными аналогами соединения **16b**. Более детальные исследования этого вопроса, однако, выходят далеко за рамки настоящей работы. В отличие от структурного аналога стилибена **16b** соединения **35b** и **35g** обладают противоопухолевой активностью в отношении всех исследованных линий, что свидетельствует о другом механизме действия производных пиридоксина, содержащих халконовый фрагмент. Следует отметить, что по сравнению с

доксорубицином эти соединения обладают значительно меньшей токсичностью, а в случае соединения **35g** и большей противоопухолевой активностью.

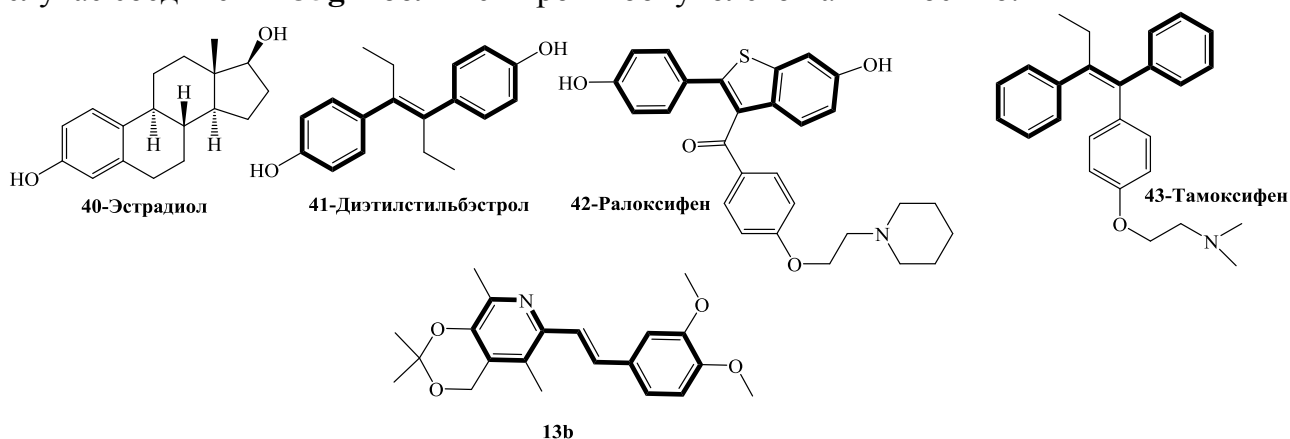


Рисунок 9 – Природный агонист эстрогеновых рецепторов **40**, селективные гормональные лекарственные препараты **41-43** и исследуемое соединение **13b**

Поскольку соединение **13b** обладает интенсивной синей флуоресценцией, удалось оценить его клеточную проницаемость с использованием микроскопии. Как видно из рисунка 10, соединение **13b** при инкубации с клетками *MCF-7* эффективно проникает через клеточную мембрану. При этом оно эффективно визуализируется как в цитоплазме, так и в ядре, где локализованы эстрогеновые рецепторы.

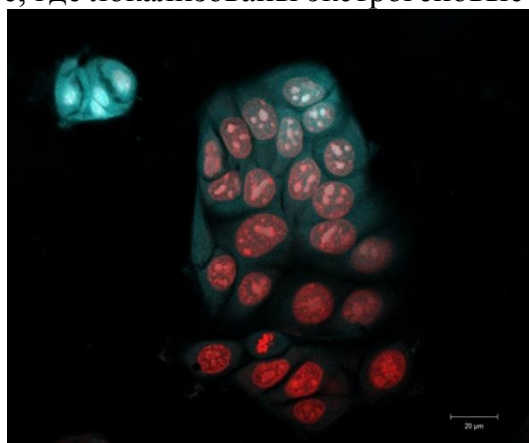


Рисунок 10 – Микрофотография клеток *MCF-7*, инкубированных с **13b** (28 мкМ, 20 мин), λ -возбуждения = 405 нм, λ -детектирования = (410-476) нм

Таким образом, синтезированные соединения могут представлять интерес при разработке высокоэффективных и безопасных противоопухолевых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Использование триэтиламина в качестве основания в реакции Виттига монофосфониевых солей пиридоксина с рядом ароматических и алифатических альдегидов приводит к образованию соответствующих олефинов в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров с высокими выходами. Реакции проводили в хлористом метиле при 80 °С в закрытом сосуде под давлением. В аналогичных условиях, но с использованием гидрида натрия, реакция Виттига бисфосфониевых солей пиридоксина приводит к образованию более сложной смеси продуктов. Помимо целевых бисалкенил-производных пиридоксина были получены его моноалкенил-производные, а также структуры дигидрохинолинового ряда и продукты в виде димеров. Таким способом был синтезирован широкий ряд *E*- и *Z*- алкенилпроизводных по пятому и шестому положению пиридоксина цикла. Варьирование условий (температуры, природы основания и растворителя) не приводит к увеличению выхода целевых продуктов.

2. Показано, что реакция Виттига альдегидов пиридоксина ряда и ацилпроизводных фосфониевых солей приводит к преимущественному образованию *E*-изомеров, что, вероятно, связано с более высокой стабильностью соответствующих илидов фосфора. Оптимизированы условия проведения реакции – синтез проводили в закрытом сосуде под давлением при температуре 70 °С в хлористом метиле, в качестве основания использовали триэтиламин. В результате были получены алкенилпроизводные по пятому и шестому положению пиридоксина цикла, содержащие фрагмент природного соединения куркумина и халконовый фрагмент.

3. Установлено, что этил-(2*Z*,4*E*)-3-гидрокси-5-(2,2,8-триметил-4*H*-[1,3]диоксина[4,5-*c*]пиридин-5-ил)пента-2,4-диеноат и этил-(2*Z*,4*E*)-3-гидрокси-5-(9-гидрокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-*c*]пиридин-6-ил)пента-2,4-диеноат, а также их структурные аналоги с различными заместителями у ацетального атома углерода находятся в растворах в дикетонной и кето-енольной формах. Положение таутомерного равновесия не зависит от природы растворителя.

4. Реакцией альдольно-кетоновой конденсации 3,4-диметоксибензальдегида и 3-гидрокси-4-метоксибензальдегида (ванилина) с рядом алкенилпроизводных пиридоксина, содержащих халконовый фрагмент по пятому положению пиридинового цикла, получены соответствующие несимметричные аналоги C5-куркумина.

5. Установлено, что соединения с характерным стильбеновым или халконовым фрагментом обладают высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток и низкой токсичностью в отношении условно-нормальных клеток. Наиболее активными являются соединения, содержащие стильбеновый фрагмент в шестом положении или халконовый фрагмент в пятом положении пиридоксина цикла. Показано, что с увеличением липофильности заместителя при ацетальном атоме углерода противоопухолевая активность соединений возрастает.

6. Методом микроскопии показано, что (*E*)-6-(3,4-диметоксистирил)-2,2,5,8-тетраметил-4*H*-[1,3]диоксина[4,5-*c*]пиридин эффективно проникает через клеточную мембрану эстрогензависимых опухолевых клеток и равномерно распределяется в цитозоле и ядре, по-видимому, связываясь с эстрогеновыми рецепторами.

Таким образом, реакция Виттига является удобным лабораторным методом получения новых алкенилпроизводных пиридоксина, которые представляют большой интерес в области разработки новых противоопухолевых лекарственных средств.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Пугачев, М.В. Синтез и противоопухолевая активность моноалкенилпроизводных пиридоксина / М.В. Пугачев, Р.С. Павельев, **Т.Н.Т. Нгуен**, А.Г. Иксанова, Ю.Г. Штырлин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. № 2. С. 532-536.
2. Pugachev, M.V. Wittig reactions of a bis-triphenylphosphonium pyridoxine derivative / M.V. Pugachev, T.M. Bulatov, **T.N.T. Nguyen**, R.S. Pavelyev, O.I. Gnezdilov, O.A. Lodochnikova, D.R. Islamov, O.N. Kataeva, K.V. Balakin, Yu.G. Shtyrilin// Tetrahedron Letters. – 2017. –V. 58. - P. 766-769.
3. Нгуен, Т.Н.Т. Синтез и противоопухолевая активность новых алкенилпроизводных пиридоксина, содержащих фрагмент куркумина / **Т.Н.Т. Нгуен**, Р.С. Павельев, А.А. Зиганшина, М.В. Пугачев, З.Р. Хисаметдинова, О.Н. Катаева, Ю.Г. Штырлин // Бутлеровские сообщения. – 2017. –Т.50, № 4. –С. 35-44.
4. Пугачев, М.В. Синтез моноалкенилпроизводных пиридоксина по реакции Виттига / М.В. Пугачев, Р.С. Павельев, Т.М. Булатов, **Т.Н.Т. Нгуен**, А.Г. Иксанова, Ю.Г. Штырлин // IV Всероссийская конференция с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения В.В. Базыльчика "Современные проблемы химической науки и фармации" - Тез. докл. - Чебоксары, 2015 – С. 122.
5. Булатов, Т.М. Синтез и противоопухолевая активность моно- и бисалкенилпроизводных пиридоксина / Т.М. Булатов, **Т.Н.Т. Нгуен** // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» - Тез. докл. - Москва, 2016.
6. Нгуен, Т.Н.Т. Синтез моно- и бисалкенилпроизводных пиридоксина по реакции Виттига и их противоопухолевая активность / **Т.Н.Т. Нгуен**, Т.М. Булатов, М.В. Пугачев, Р.С. Павельев, Ю.Г. Штырлин // V Всероссийская конференция с международным участием "Современные проблемы химической науки и фармации" - Тез. докл. - Чебоксары, 2016 – С. 112-113.
7. Нгуен, Т.Н.Т. Синтез и противоопухолевая активность алкенилпроизводных пиридоксина / **Т.Н.Т. Нгуен**, М.В. Пугачев, Р.С. Павельев, Ю.Г. Штырлин // Кластер конференций по органической химии «ОргХим-2016» - Тез. докл. - Санкт-Петербург, 2016. – С. 632.
8. Нгуен, Т.Н.Т. Синтез новых производных пиридоксина содержащих фрагмент куркумина / **Т.Н.Т. Нгуен**, А.А. Фомина, Р.С. Павельев, М.В. Пугачев, Ю.Г. Штырлин // V Всероссийская конференция с международным участием "Современные проблемы химической науки и фармации" - Тез. докл. – Чебоксары, 2016. – С. 114-115.
9. Булатов, Т.М. Синтез и противоопухолевая активность алкенилпроизводных пиридоксина / Т.М. Булатов, М.В. Пугачев, **Т.Н.Т. Нгуен**, Р.С. Павельев, А.Г. Иксанова, Ю.Г. Штырлин // X Международная конференция молодых учёных по химии «Менделеев-2017» - Тез. докл. - Москва, 2017. – С. 372.